

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Juli 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/061425 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 1/06, 1/04

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): LUBATSCHOWSKI, Holger [DE/DE]; Nelkenweg
1a, 30989 Gehrden (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014951

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Dezember 2003 (29.12.2003)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KERMANI, Omid
[DE/DE]; Donauweg 1, 50858 Köln (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: STILKENBÖHMER, Uwe; Eisenführ, Speiser
& Partner, Postfach 10 60 78, 28060 Bremen (DE).

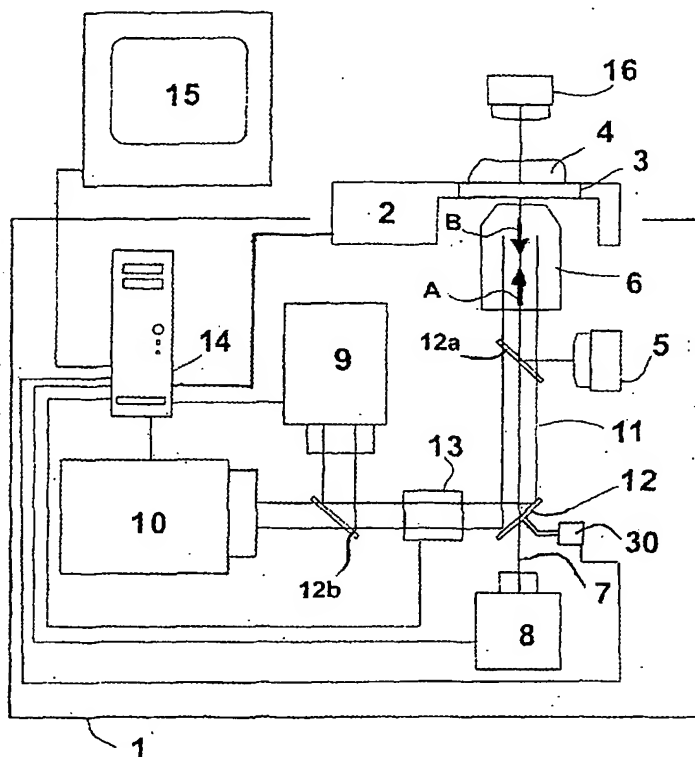
(30) Angaben zur Priorität:
103 00 091.7 4. Januar 2003 (04.01.2003) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AI., AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROTOME

(54) Bezeichnung: MIKROTOM



(57) Abstract: The invention relates to a microtome, comprising a housing device with a support (3), for housing at least one section of a processed object (4) and a separating device (6, 10, 13). Conventional microtomes after the state of the art have the disadvantage that a fixation of the processed object is necessary and a limited freedom in the choice of the cutting section results. The present invention avoids said disadvantage, whereby the separating device comprises a laser beam source (10) and means for focussing (6; 13) the laser beam. The focussed beam point (22), generated by the focussing, may be displaced relative to the support (3) and may be supplied to a location on the separating plane (19; 20) of the processed object (4) in order to create a material separation at this location. The invention further relates to a method for microtoming which can be carried out to advantage by means of said microtome.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Mikrotom, umfassend eine Aufnahmevorrichtung mit einem Träger (3) zum Aufnehmen von zumindest einem Abschnitt eines Bearbeitungsobjekts (4), und eine Trenneinrichtung (6, 10, 13). Bekannte Mikrotome der vorgenannten Art weisen den Nachteil auf, dass eine

Fixation des Bearbeitungsobjekts erforderlich ist und eine beschränkte Freiheit bei der Wahl der Schnittführung besteht. Die Erfindung vermeidet

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/061425 A1



CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

diese Nachteile, indem die Trenneinrichtung wenigstens eine Laser-Strahlungsquelle (10) und Mittel zur Fokussierung (6; 13) der Laserstrahlung umfasst, und der durch die Fokussierung erzeugte Strahlfokus (22) relativ zu dem Träger (3) bewegbar ist und auf einen Ort der Trennfläche (19; 20) des Bearbeitungsobjekts (4) leitbar ist, um an diesem Ort eine Materialtrennung zu bewirken. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Mikrotomieren, welches vorteilhaft mit dem erfindungsgemäßen Mikrotour ausgeführt werden kann.

Mikrotom

Die Erfindung betrifft ein Mikrotom mit einer Aufnahmevorrichtung mit einem Träger zum Aufnehmen von zumindest einem Abschnitt eines Bearbeitungsobjektes, und einer Trenneinrichtung. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Mikrotomieren von

5 Bearbeitungsobjekten.

Mikrotome der vorgenannten Art und entsprechende Verfahren zum Mikrotomieren dienen dazu, von einem zu untersuchenden Bearbeitungsobjekt dünne Scheibchen abzutrennen, um diese beispielsweise mittels eines mikroskopischen Verfahrens zu untersuchen. Mikrotome

10 werden häufig verwendet, um von einer Gewebeprobe dünne Gewebeschnitte zu gewinnen, die mittels eines Durchlichtmikroskopes untersucht werden können.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Im Stand der Technik sind Mikrotome bekannt, die eine Einspannvorrichtung für das Bearbeitungsobjekt und ein relativ zu dieser Einspannvorrichtung bewegbares Messer beinhalten. Das Messer ist leicht verfahrbar auf einem Schlitten befestigt und die Schneidkante des Messers kann in einer Trennebene hin- und hergefahren werden. Das Bearbeitungsobjekt kann in der Einspannvorrichtung eingespannt werden und mitsamt dem Träger der Einspannvorrichtung senkrecht zu der Trennebene verschoben werden.

Ein Mikrotomiervorgang mit dem bekannten Mikrotom wird in der Weise ausgeführt, dass das Bearbeitungsobjekt durch die senkrecht zur Trennebene gerichtete Verschiebewegung in eine solche Position relativ zur Trennebene gebracht wird, dass bei einer Verfahrbewegung des Schlittens mit dem Messer in der Trennebene eine dünne Scheibe von dem Bearbeitungsobjekt abgetrennt wird. Das Messer wird hiernach in seine Ausgangsstellung zurückbewegt und das Bearbeitungsobjekt durch eine in der Regel sehr kleine Zustellungsverschiebewegung $< 10\mu\text{m}$ des Trägers relativ zu dem Messer in senkrechter Richtung zur Trennebene so positioniert, dass bei einem erneuten Verfahren des Messers wiederum ein dünnes Scheibchen vom Bearbeitungsobjekt abgetrennt wird.

Dieser Vorgang wird regelmäßig mehrfach wiederholt, bis eine dünne Scheibe von dem zu untersuchenden Bereich des Bearbeitungsobjektes gewonnen wurde.

Um zu vermeiden, dass sich das Bearbeitungsobjekt bei dem Schneidvorgang mit dem bekannten Mikrotom verformt, ist es regelmäßig erforderlich, das Bearbeitungsobjekt mittels zusätzlicher Maßnahmen zu verfestigen und/oder zu stützen. Als solche zusätzliche Maßnahme ist es bekannt, Bearbeitungsobjekte, deren Deformationsfähigkeit durch Abkühlung verringert werden kann, vor dem Mikrotomieren tief zu kühlen. Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass die aus gefrorenen Bearbeitungsobjekten gewonnenen, sog. Gefrierschnitte regelmäßig

viele Details des Bearbeitungsobjektes nicht zeigen und darüber hinaus durch das Einfrieren Artefakte im Bearbeitungsobjekt erzeugt werden. Als weiterer Nachteil des Einfrierens ist bekannt, dass eine Deformation des Bearbeitungsobjektes und des abgetrennten dünnen Scheibchens
5 mittels des Einfrierens nicht vollständig vermieden werden kann. Darüber hinaus erfordert das Einfrieren des Bearbeitungsobjektes zusätzlichen Aufwand, was das schnelle Herstellen von mikroskopierbaren Scheibchen verhindert und die Herstellung insgesamt verteuert.

Weiterhin ist als Maßnahme zur Stützung eines Bearbeitungsobjektes
10 bekannt, dieses in ein Einbettungsmaterial einzubetten. Dabei ist es bei Bearbeitungsobjekten in Form von Gewebeproben regelmäßig erforderlich, das Bearbeitungsobjekt vollständig mit dem Einbettungsmaterial zu durchtränken, um eine ausreichende Verfestigung der Probe zu erzielen.

Als Einbettungsmaterialien sind Paraffine und verschiedene Kunststoffe
15 bekannt. Zum Erzielen einer Durchtränkung ist bekannt, dem Bearbeitungsobjekt darin enthaltenes Wasser oder Fixationsmittel in einem mehrstufigen chemischen Prozess zu entziehen und durch ein Fluid zu ersetzen, welches sich mit dem Einbettungsmaterial gut mischen lässt. Hierauf folgend kann die Durchtränkung mit dem Einbettungsmaterial im
20 flüssigen, gegebenenfalls durch Erwärmung verflüssigten, Zustand erfolgen und nachfolgend das Einbettungsmaterial verfestigt werden, z.B. durch Abkühlen aus einem zuvor erwärmten Zustand oder durch eine chemische Vernetzungsreaktion.

Die Einbettung bzw. Durchtränkung mit einem Einbettungsmaterial ist
25 zeitlich und hinsichtlich des verfahrenstechnischen Aufwands noch aufwendiger als das Einfrieren des Bearbeitungsobjektes. Durch die Einbettung bzw. Durchtränkung wird oftmals eine Veränderung des Bearbeitungsobjektes erzeugt, so dass bei der späteren Untersuchung der gewonnenen Scheibchen Artefakte beobachtet werden. Diese
30 Artefakte sind typischerweise eine Schrumpfung oder Ausdehnung der

Probe. Im Falle von Gewebeproben treten regelmäßig auch durch Unterbindung oder Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge in Geweben verursachte Veränderungen der Probe auf.

Die mit bekannten Mikrotomen gewonnenen dünnen Schnitte müssen häufig noch nachträglich bearbeitet werden. So ist es bekannt, diese Schnitte zu mikrodisektieren. Bei der Mikrodisektion wird mit einem fokussierten Laserstrahl ein Bereich des Probenschnittes mit einer zweidimensionalen Bewegung umfahren und auf diese Weise der umfahrene Bereich des Schnittes aus dem gesamten Probenschnitt herausgetrennt. Ein solches Mikrodisektionsverfahren ist beispielsweise aus WO 97/29354 bekannt. Das Verfahren der Mikrodisektion ermöglicht zwar eine Heraustrennung des zu mikrodisektierenden Bereichs aus einem Schnitt, jedoch ist es zuvor erforderlich, diesen Schnitt durch Mikrotomieren der Probe herzustellen. Bei diesem vorangehenden Mikrotomieren treten die zuvor beschriebenen Nachteile, wie beispielsweise die Notwendigkeit einer Verfestigung beziehungsweise Einbettung des Bearbeitungsobjektes, auf.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Mikrotom und ein Verfahren zum Mikrotomieren bereitzustellen, welches eine schonendere Mikrotomierung eines Bearbeitungsobjektes ermöglicht.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Mikrotom der eingangs genannten Art gelöst, bei dem die Trenneinrichtung wenigstens eine Laser-Strahlungsquelle und Mittel zur Fokussierung der Laserstrahlung umfasst, wobei der durch die Fokussierung erzeugte Strahlfokus relativ zu dem Träger bewegbar ist und auf einen Ort der Trennfläche des Bearbeitungsobjektes leitbar ist, um an diesem Ort eine Materialtrennung zu bewirken. Das erfindungsgemäße Mikrotom umfasst weiterhin Mittel zum gepulsten Einbringen des Strahlfokus in den Ort der

Trennfläche welche dazu eingerichtet sind, um Pulse mit einer Einwirkdauer < 1 Piko-Sekunde ($1 \cdot 10^{-12}$ Sekunde) zu erzeugen.

Unter Einwirkdauer wird dabei die Zeit verstanden, für die der Strahlfokus an dem Ort der Trennfläche einwirkt. Die Energie, welche pro Laserpuls zum Schneiden notwendig ist, liegt im Bereich von einem Piko-Joule (pJ) bis einem Milli-Joule (mJ), vorzugsweise im Bereich von mehreren Piko-Joule. Eine Pulsenergie von 100 Nano-Joule (nJ) hat sich ebenfalls als vorteilhaft erwiesen.

Eine Einwirkdauer von weniger als einer Piko-Sekunde, ein sogenannter ultrakurzer Puls, hat sich dabei als besonders vorteilhaft für die meisten Materialien (insbesondere biologische Gewebe) erwiesen. Derzeit technisch realisierbare Einwirkdauern liegen dabei im Bereich bis hinunter zu zwanzig Femtosekunden ($20 \cdot 10^{-15}$ Sekunde); es sind jedoch auch, sofern technisch realisierbar, noch kürzere Einwirkdauern für das erfindungsgemäße Mikrotom sinnvoll verwendbar. Die Frequenz der einwirkenden Pulse liegt vorzugsweise oberhalb von 1000 Hertz. Insbesondere hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Pulsfrequenz oberhalb von 100.000 Hertz liegt. Besonders bevorzugt ist es, wenn die Pulsfrequenz zwischen 100kHz und 10MHz liegt.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung nutzbare Einwirkdauer und Pulsfrequenz kann in einem weiten Bereich variiert werden, ohne daß das erfindungsgemäße Verfahren durch die Variation nicht mehr ausführbar würde. Insbesondere kann dabei die Pulsdauer und die Pulsfrequenz auf das jeweils zu mikrotomierende Material abgestimmt werden.

Dabei kann die Einwirkdauer des Pulses länger oder kürzer als die Pause zwischen zwei Pulsen sein oder mit dieser übereinstimmen, wobei eine Pulsdauer bevorzugt wird, die kürzer ist als die Pause zwischen zwei Pulsen.

Wird eine ausreichend kurze Pulsdauer im Bereich weniger Femtosekunden gewählt, so ist die Pulsfrequenz in einem weiten Bereich variierbar. So lassen sich beispielsweise bei einer Pulsdauer von 100 fs Pulsfrequenzen von beispielsweise 1 kHz aber auch von 1
5 MHz realisieren.

Die Materialtrennung bei dem erfindungsgemäßen Mikrotom wird durch eine lokale Aufheizung des Materials über den Prozess der Multiphotonenabsorption an dem Ort der Trennfläche, auf den der Strahlfokus geleitet ist, und eine daraus folgende Vergasung/Verdampfung des Materials erreicht. Neben diesem angestrebtem Primäreffekt, dem sogenannten optischen Durchbruch, können auch sekundäre Nebeneffekte auftreten. Insbesondere bei hohen Pulsenergien können im Einzelfall als Nebeneffekte größere Gas- und Kavitationsblasen entstehen, welche ein im Vergleich zu kleinen Gasbläschen geringes
10 Oberflächen/Volumen-Verhältnis haben und dadurch ihren Gasinhalt eventuell nur langsam an die Umgebung abgeben. Dies wäre nachteilig für den angestrebten Schneideffekt. Weiterhin könnten die größeren Gas- und Kavitationsbläschen Verformungen verursachen und die präzise Positionierung des Strahlfokus und damit die präzise
15 Schnittführung behindern. Darüber hinaus könnten innerhalb des Bearbeitungsobjektes Druckwellen auftreten, die die Präzision des Schneidvorgangs eventuell beeinträchtigen könnten.

Der photodisruptive Effekt, also die angestrebte Schneidwirkung des Laserstrahls, erfordert regelmäßig eine gewisse mindestens zu
25 erreichende Intensität am Ort der Trennfläche. Typischerweise liegt diese Intensität für Bearbeitungsobjekte aus transparentem Material bei etwa 10^{12} W/cm² oder darüber. Die sekundären Nebeneffekte sind hingegen nicht von der Laserintensität abhängig sondern von der Laserenergie und ihr Ausmaß und ihre Anzahl nehmen mit steigenden
30 Laserenergien zu. Um die sekundären Effekte daher zu verringern oder zu vermeiden ist es daher zweckmäßig, eine geringe Laserenergie und

eine hohe Laserintensität zu erzielen. Dies kann beispielsweise durch gepulstes Einbringen des Strahlfokus in den Ort der Trennfläche erreicht werden.

5 Durch ein gepulstes Einbringen des Strahlfokus können diese negativen Effekte daher vermieden oder zumindest verringert werden. Dabei ist es insbesondere von Vorteil, wenn die Strahlfokuspulse hohe Intensitäten aber wenig Energie besitzen, d.h. die Energie des Pulses auf ein kleines Volumen konzentriert wird, da hierdurch negative Nebeneffekte, wie die zuvor beschriebene Erzeugung von größeren Gas- und
10 Kavitationsblasen, vermieden werden können. Durch einen einzelnen Puls kann – abhängig vom Bearbeitungsobjekt und den eingestellten Trennparametern – eine teilweise oder vollständige Trennung an dem im Bereich des Strahlfokus angeordneten Ort der Trennfläche erzeugt werden. Darauf folgend kann, im Falle einer nur teilweisen lokalen
15 Trennung, durch die Einwirkung eines oder weiterer Pulse auf den gleichen Ort der Trennfläche eine vollständige Trennung erzielt werden; nach einer Relativbewegung des Trägers zu dem Strahlfokus kann dann an einem benachbarten Ort wiederum eine Materialtrennung erzeugt werden, wodurch ein zusammenhängender Schnitt entlang der
20 Trennfläche ausgeführt werden kann.

Das erfindungsgemäße Mikrotom bewirkt eine Materialtrennung durch die Einwirkung des Strahlfokus eines Laserstrahles. Diese Einwirkung bewirkt eine lokale Erwärmung des Materials des Bearbeitungsobjekts und in Folge dieser Erwärmung einen lokalen Übergang des Materials in
25 den gasförmigen Zustand. Bei einer Relativbewegung zwischen dem Strahlfokus und dem Träger (mit dem Bearbeitungsobjekt) wirkt der Strahlfokus auf mehrere, zueinander benachbarte Orte der Trennfläche ein, so dass ein zusammenhängender Schnitt ausgeführt werden kann.

Das erfindungsgemäße Mikrotom vermeidet die bei bekannten, mit
30 Messern oder Klingen arbeitenden Mikrotomen aufgrund der Schneid-

kraft auftretende Gefahr einer Verformung des Bearbeitungsobjektes oder der von dem Bearbeitungsobjekt abgetrennten dünnen Scheibe. Es ist daher bei Verwendung des erfindungsgemäßen Mikrotoms nicht erforderlich, das Bearbeitungsobjekt vor der Mikrotomierung einzu-
5 betten, zu durchtränken oder in anderer Weise zu verfestigen und/oder zu stützen. Artefakte in Folge von Einwirkungen eines Einbettungsmaterials oder eines Einfriervorganges werden somit vermieden.

Das erfindungsgemäße Mikrotom erlaubt eine freie Schnittführung.

Als überraschender Vorteil des erfindungsgemäßen Mikrotoms hat sich
10 gezeigt, dass es mittels des Mikrotoms auch möglich ist, lebendes Gewebe zu trennen und dabei dünne Scheibchen in vitaler Form zu gewinnen.

Die Laser-Strahlungsquelle des erfindungsgemäßen Mikrotoms emittiert vorzugsweise eine Laserstrahlung mit einer Wellenlänge im sichtbaren
15 (VIS) oder nahen infraroten (NIR) Spektralbereich, beispielsweise also zwischen etwa 700nm bis 1400nm, damit die Laserstrahlung nur eine geringe Abschwächung, zum Beispiel infolge Absorption/Streuung, innerhalb eines üblichen Bearbeitungsobjektes erfährt.

Vorzugsweise kann in allen drei Raumrichtungen eine Relativbewegung
20 zwischen dem Strahlfokus und dem Träger ausgeführt werden. Hierzu kann beispielsweise eine mit dem Träger verbundene 3-D-Bewegungseinrichtung vorgesehen werden. Durch die dreidimensionale, relative Beweglichkeit des Strahlfokus zu dem Träger, und damit zu dem durch den Träger aufgenommenen Bearbeitungsobjekt, können mit dem
25 erfindungsgemäßen Mikrotom Schnittführungen in einer gegenüber den bekannten Mikrotomen wesentlich variableren Weise ausgeführt werden. So ist es beispielsweise möglich, eine dünne Scheibe aus der Oberfläche eines Bearbeitungsobjektes herauszulösen, indem ein parallel zur Oberfläche liegender erster Trennflächenbereich und ein

zweiter, senkrecht zu dieser Oberfläche liegender Trennflächenbereich, der den ersten Trennflächenbereich umrandet, erzeugt werden. Es ist folglich nicht mehr, wie bei bekannten Mikrotomen, erforderlich, stets eine gesamte, sich bis zu den Rändern des Bearbeitungsobjekt erstreckende Trennflächenebene vom Untersuchungsobjekt abzutrennen, sondern es können auch Teilbereiche (beispielsweise Bereiche mit rechteckigen oder runden Konturen) einer solchen Trennflächenebene herausgetrennt werden. Auf diese Weise ist eine sehr schonende Präparation eines Bearbeitungsobjektes möglich, bei der nur die für die Untersuchung wesentlichen Teile aus dem Bearbeitungsobjekt herausgetrennt werden.

Die Eindringtiefe des Strahlfokus der Laserstrahlung ist abhängig von dem Absorptionsvermögen des Materials/der Materialien des Bearbeitungsobjektes für die zum Schneiden verwendete Laserstrahlung. Die Laser-Strahlungsquelle eines erfindungsgemäßen Mikrotoms wird vorzugsweise so ausgelegt, dass ein Materialtrennung noch in einer Eindringtiefe von $\geq 10\mu\text{m}$ erreicht werden kann, bezogen auf biologisches Gewebe als Bearbeitungsobjekt. Eine solche Eindringtiefe entspricht der Dicke eines für eine mikroskopische Untersuchung benötigten Scheibchens oder überschreitet diese Dicke sogar. In vielen biologischen Geweben kann mit dem erfindungsgemäßen Mikrotom in einer Tiefe von 2mm und darüber geschnitten werden.

In Abhängigkeit von den Eigenschaften des Bearbeitungsobjektes, insbesondere von dessen Absorptionsvermögen, ist es mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch möglich, eine Materialtrennung in einem Abstand von der Oberfläche des Bearbeitungsobjektes zu erzielen, welcher die übliche Dicke eines für eine Untersuchung zu erzeugenden dünnen Scheibchens überschreitet. Auf diese Weise können mit dem erfindungsgemäßen Mikrotom in wesentlich rationellerer Weise Scheibchen aus einer großen Tiefe eines

Untersuchungsobjektes gewonnen werden, als es mit bekannten Mikrotomen möglich ist, da es nicht erforderlich ist, sich mittels Abtrennen vieler dünner Scheibchen bis zu der gewünschten Tiefe vorzuarbeiten.

- 5 Bei einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrotoms sind die Mittel zur Fokussierung der Laserstrahlung dazu eingerichtet, den Strahlfokus in zumindest einer Raumrichtung relativ zu dem Träger zu bewegen. So kann, beispielsweise indem die Fokussierungsmittel eingerichtet sind, die Divergenz/Konvergenz des
- 10 Laserstrahls und damit die Brennweite zu ändern, und/oder indem die Fokussierungsmittel selbst relativ zum Träger beweglich sind, eine einfache und präzise zu steuernde Relativbewegung des Strahlfokus zu dem Träger (und dem zugehörigen Bearbeitungsobjekt) entlang der Strahlrichtung erreicht werden. Vorzugsweise umfassen die Mittel zur
- 15 Fokussierung der Laserstrahlung verschieb- oder verschwenkbare optische Medien, beispielsweise Spiegel und/oder Linsen, um eine Relativbewegung des Strahlfokus in einer, zwei oder drei Raumrichtungen zu bewirken. So kann zur Veränderung der Lage des Strahlfokus ein optisches Medium in den Laserstrahl eingebracht
- 20 werden oder ein im Laserstrahl angeordnetes optisches Medium verkippt werden, welches die optische Weglänge verkürzt oder verlängert.

- Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform sind Mittel zur Führung der Laserstrahlung vorgesehen, um den Strahlfokus in zumindest einer
- 25 Raumrichtung relativ zu dem Träger zu bewegen. Diese Mittel könne beispielsweise als Spiegel ausgeführt sein, die um eine oder zwei Achsen verschwenkbar sind.

- Die Mittel zur Führung der Laserstrahlung können mit den zuvor beschriebenen Mitteln zur Bewegung des Trägers vorteilhaft kombiniert
- 30 werden. So kann beispielsweise eine Bewegungsrichtungskomponente

mittels Führung des Laserstrahls und die anderen beiden Bewegungsrichtungskomponenten mittels Bewegung des Trägers realisiert werden. Ebenfalls ist es vorteilhaft, zwei Bewegungsrichtungskomponenten mittels Führung des Laserstrahls zu realisieren und die verbleibende dritte Komponente mittels Bewegung des Trägers.

Weiterhin vorteilhaft ist es, sowohl Mittel zur Führung des Laserstrahles als auch Mittel zur Relativbewegung zwischen Träger und Optik für die Relativbewegung des Strahlfokus zu dem Träger in einer oder mehreren Raumrichtungen vorzusehen. Hierdurch kann beispielsweise eine Grob- und Feineinstellung durch die entsprechenden verschiedenen Mittel zur Relativbewegung erreicht werden.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform weisen die Mittel zur Fokussierung der Laserstrahlung eine numerische Apertur $\geq 0,65$, vorzugsweise eine numerische Apertur $\geq 1,2$ auf. Ein wesentlicher Vorteil bei Verwendung der angegebenen, großen numerischen Aperturen ist, dass ein starker Fokussierwinkel erreicht wird und in den in Strahlrichtung vor und hinter dem Strahlfokus gelegenen Bereichen der Laserstrahlung eine relativ zur Strahlungsenergiedichte im Strahlfokus nur geringe Strahlungsenergiedichte vorliegt, wodurch eine scharf abgegrenzte Materialtrennung im Bereich des Strahlfokus erreicht wird und eine Materialtrennung in den Bereichen davor und dahinter vermieden wird.

Die Mittel zum gepulsten Einbringen können bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform mit der Laserstrahlungsquelle zusammenwirken. So kann durch Mittel zur pulsierenden Unterbrechung der Energieversorgung der Laserstrahlungsquelle eine gepulste Laserstrahlung erzeugt werden und dadurch ein gepulstes Einbringen des Strahlfokus in den Ort der Trennfläche erreicht werden.

Die Mittel zum gepulsten Einbringen können insbesondere nach dem Prinzip der „chirped pulse“-Verstärkung arbeiten. Zum Prinzip der „chirped pulse“-Verstärkung wird auf die DE 100 20 559 und dort insbesondere auf den Absatz [0009] sowie auf die dort genannte
5 Veröffentlichung D. Strickland, G. Mourou, Opt. Commun. 56, 219 (1985) verwiesen.

Die Mittel zum gepulsten Einbringen können bei einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrotoms dazu eingerichtet sein, einen kontinuierlich erzeugten Laserstrahl pulsierend zu unter-
10 brechen und/oder pulsierend von dem Ort der Trennfläche wegzulenken. Hierdurch wird, ohne dass man die Aussendung der Laserstrahlung aus der Laser-Strahlungsquelle unterbricht, ein gepulstes Einbringen des Strahlfokus in den Ort der Trennfläche erreicht. Der Strahl kann vorteilhafter Weise absorbiert werden. Der Strahl kann aber alternativ
15 auch reflektiert und dadurch von dem Ort der Trennfläche weggelenkt werden zu einem Ort außerhalb des Bearbeitungsobjekts oder zu einer Stelle des Bearbeitungsobjekts, welche nicht für die beabsichtigte Untersuchung des Bearbeitungsobjekts relevant ist.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform eines Mikrotoms mit
20 gepulster Einbringung des Strahlfokus sind Steuerungsmittel vorgesehen, welche die zeitliche Abfolge der Strahlungspausen steuern und/oder mit Mitteln zur Erfassung der zeitlichen Abfolge der Strahlungspausen verbunden sind und/oder welche die Relativbewegung zwischen dem Strahlfokus und dem Träger in
25 Abhängigkeit von der zeitlichen Abfolge der Strahlungspausen steuern. Die Steuerungsmittel dienen zur Synchronisation der Laserstrahlpulse mit der Relativbewegung zwischen Strahlfokus und Träger. Als „zeitliche Abfolge“ der Strahlungspausen werden hierbei die Dauer und die Frequenz der Strahlungspausen verstanden. Bei Einsatz dieser
30 Steuerungsmittel wird in Abhängigkeit von der Abfolge der Strahlungsunterbrechungen bzw. der Strahlungseinwirkungen eine

- Bewegung zwischen Träger und Strahlfokus und hierdurch die Einwirkdauer der einzelnen Pulse der Laserstrahlung auf die zu trennenden Orte der Trennfläche gesteuert. Dabei können die Steuerungsmittel entweder (a) sowohl die zeitliche Abfolge der Strahlungspulse und die Relativbewegung steuern oder (b) die zeitliche Abfolge der Strahlungspulse lediglich erfassen und in deren Abhängigkeit die Relativbewegung steuern. Bei Steuerungsart (b) kann beispielsweise auf Pulsfrequenzen reagiert werden, welche in Abhängigkeit der Belastung und der Energieversorgung der Laser-Strahlungsquelle variieren.
- 10 Weiterhin können Steuerungsmittel vorgesehen sein, welche mit Mitteln zur Erfassung der Relativbewegung zwischen dem Strahlfokus und dem Träger verbunden sind und die zeitliche Abfolge der Strahlungspausen in Abhängigkeit von der Relativbewegung steuern. Diese Ausführungsform ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn eine manuelle
- 15 Steuerung der Relativbewegung durch den Benutzer des Mikrotoms erfolgt. Auch diese Steuerungsmittel dienen zur Synchronisation der Laserstrahlungspulse mit der Relativbewegung zwischen Strahlfokus und Träger. So kann in Abhängigkeit von der manuell gesteuerten Relativbewegung die Einwirkung bzw. Unterbrechung der gepulsten
- 20 Laserstrahlung durch die Steuerungsmittel gesteuert werden. Auf diese Weise kann vermieden werden, dass bei schnellen Relativbewegungen keine oder eine nur unvollständige Durchtrennung in der Trennfläche erfolgt, denn die Pulsfrequenz oder die Einwirkdauer kann in diesem Fall erhöht werden. Weiterhin kann verhindert werden, dass eine zu hohe
- 25 Strahlungsenergie in einen Ort eingebracht wird, wenn keine oder eine langsame Relativbewegung erfolgt, denn in diesem Fall können die Steuerungsmittel die Frequenz und/oder die Einwirkdauer verringern oder die Einwirkung des Strahlfokus auf den Ort der Trennfläche vollständig verhindern.
- 30 Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform sind Mittel zur Steuerung der Relativbewegung zwischen dem Träger und dem

Strahlfokus entlang einer gekrümmten Trennfläche vorgesehen. Zur Steuerung der Relativbewegung entlang einer gekrümmten Trennfläche ist es regelmäßig erforderlich, die Relativbewegung in mindestens zwei, in der Regel drei Raumrichtungen auszuführen. Die Relativbewegung
5 kann dabei durch Mittel zur Führung oder Mittel zur Fokussierung der Laserstrahlung oder durch eine mit dem Träger oder der Laserstrahlungsquelle zusammenwirkende Bewegungseinrichtung oder eine Kombination der vorgenannten Mittel erreicht werden. Mit der vorteilhaften Ausführungsform lässt sich von Untersuchungsobjekten mit
10 gekrümmter Oberfläche eine oberflächenparallele, dünne Scheibe trennen. Weiterhin wird mit dieser Ausführungsform erreicht, dass aus einem Bearbeitungsobjekt eine dünne Scheibe herausgetrennt werden kann, die in beliebiger Ausrichtung und Ausgestaltung in dem Bearbeitungsobjekt liegt.

15 Die Relativbewegung zwischen Strahlfokus und Träger kann automatisch oder manuell erfolgen. Die manuelle Steuerung kann beispielsweise über eine mit den Steuerungsmitteln zusammenwirkende Bedienungseinheit, beispielsweise einen Joystick, erfolgen, die dem Benutzer eine manuelle Steuerung der Relativbewegung mittels der
20 Fokussiermittel, der Leitmittel und/oder der Bewegungseinrichtung ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Mikrotom umfasst vorteilhafterweise Mittel zur Beobachtung des Bearbeitungsobjekts. Die Beobachtungsmittel können beispielsweise als Lupe, Mikroskop oder ähnliches ausgeführt sein. Sie
25 dienen beispielsweise dazu, den Materialtrennungsvorgang vorzubereiten, indem mit Hilfe der Beobachtungsmittel eine Definition der Ausrichtung und Gestaltung der Trennfläche und folglich der Relativbewegung zwischen Strahlfokus und Träger vorgenommen wird. Weiterhin können die Beobachtungsmittel dazu dienen, den Materialtrennvorgang selbst
30 zu beobachten, um so beispielsweise eine Kontrolle der automatisch

ausgeführten Relativbewegung oder um eine manuelle Steuerung der Relativbewegung durchzuführen.

Die Beobachtungsmittel können insbesondere ein optisches Mikroskop umfassen, das nach dem Auflicht- und/oder Durchlichtverfahren betreibbar ist. Dabei eignet sich insbesondere ein optisches Mikroskop, dessen Strahlenachse etwa parallel zu der Strahlenachse des Laserstrahls im Bereich des Strahlfokus liegt, insbesondere mit dieser etwa zusammenfällt. Weiterhin ist insbesondere ein optisches Mikroskop geeignet, welches sowohl als Durchlicht- wie auch als Auflichtmikroskop arbeiten kann, um dadurch, in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Bearbeitungsobjekts, also insbesondere dessen geometrischen Abmessungen und Absorptionseigenschaften für die zur Beobachtung eingesetzte Strahlung, ein jeweils geeignetes Mikroskopiervorgehen einsetzen zu können.

Weiterhin können die Beobachtungsmittel Mittel zur Darstellung von zumindest einem Abschnitt des Bearbeitungsobjekts anhand der zurück gestreuten Laserstrahlung beinhalten. Hierdurch wird in vereinfachter Weise eine Beobachtung des Bearbeitungsobjekts ohne zusätzliche Beleuchtungseinrichtungen möglich.

Die vorgenannten Darstellungsmittel können insbesondere einen Detektor zur Erfassung der von dem Abschnitt des Bearbeitungsobjekts zurückgestreuten Strahlung, Mittel zur Erfassung der von einer Referenzebene reflektierten kohärenten Strahlung, und Mittel zur Erzeugung einer bildlichen Darstellung des Abschnitts des Bearbeitungsobjekts mittels Überlagerung der von dem Abschnitt des Bearbeitungsobjekts zurück gestreuten Laserstrahlung und der von der Referenzebene reflektierten kohärenten Strahlung umfassen. Diese Ausführungsform ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn die Intensität der einzelnen Laserpulse so eingestellt werden kann, dass ein materialtrennender Effekt (eine „photodisruptive Wirkung“) nicht auftritt

und insbesondere die Intensität der Laserpulse zum Zwecke der Darstellung des Bearbeitungsobjekts geringer eingestellt werden kann als zum Zwecke der Materialtrennung. Durch die besagten Merkmale wird die Darstellung der Probe mit der Methode der optischen Kohärenztomographie (OCT) erreicht. Eine detaillierte Beschreibung des OCT-Darstellungsverfahrens kann der DE 100 20 559 A1 insbesondere deren Absätzen 0037, 0038 und 0041-0051 entnommen werden.

Bezugnehmend auf diese Offenlegungsschrift kann das OCT-Verfahren kurz zusammengefasst werden als ein Abbildungsverfahren, bei dem eine kohärente Strahlung, wie beispielsweise eine Laserstrahlung, geteilt wird, ein erster Teil der Laserstrahlung auf ein abzubildendes Objekt, in diesem Fall das Bearbeitungsobjekt, gerichtet wird und ein zweiter Teil auf eine Referenzebene gerichtet wird. Die von dem abzubildenden Objekt und der Referenzebene reflektierten Strahlungsanteile werden erfasst und zur Deckung gebracht und durch dreidimensionales Abscannen des abzubildenden Objekts kann eine dreidimensionale Darstellung erzeugt werden, indem die Interferenz der überlagerten Pulse mittels eines Fotodetektors detektiert wird.

Mit Hilfe des OCT-Verfahrens können Strukturen mit einer Auflösung von bis zu $1\mu\text{m}$ dargestellt werden. Das OCT-Verfahren hat eine von dem Absorptionsvermögen des untersuchten Materials abhängige Eindringtiefe. Selbst in stark streuende Gewebe wird regelmäßig eine Eindringtiefe von $>2\text{mm}$ erreicht.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Mikrotomieren mit den Merkmalen gemäß Anspruch 14. Das Verfahren ist insbesondere geeignet, um mit dem erfindungsgemäßen Mikrotom ausgeführt zu werden.

Einige vorteilhafte Verfahrensformen sind in den Ansprüchen 15 – 22 angegeben und entsprechen einer Ausführung des Verfahrens mittels

vorteilhafter Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Mikrotoms. Insoweit wird auf die vorstehende Beschreibung verwiesen.

In manchen Fällen ist es vorteilhaft, wenn in einer ersten Phase des Schneidvorgangs ein oder mehrere voneinander beabstandete Bereiche der Trennfläche getrennt werden und in einer letzten Phase des Schneidvorgangs eine vollständige Trennung entlang der Trennfläche erfolgt, indem die zwischen den beabstandeten Bereichen liegenden Bereiche getrennt werden. Die Aufteilung des Trennvorgangs in eine erste Phase und eine letzte Phase, wobei die letzte Phase beispielsweise eine der ersten Phase direkt folgende zweite Phase sein kann, ist zur Vermeidung von Deformationen während des Trennvorgangs und zur Vermeidung von Deformationen der abgetrennten dünnen Scheibe vorteilhaft.

In der ersten Phase wird dabei vorzugsweise an mehreren lokal umgrenzten Bereichen eine Materialtrennung erzeugt. Zwischen diesen Bereichen bleiben ungetrennte Bereiche, oder „Stege“, stehen. Diese Stege halten die nach der ersten Phase erst teilweise abgetrennte Scheibe noch am Bearbeitungsobjekt fest und vermeiden so ein Verformen der Scheibe. In folgenden Phasen des Trennvorgangs erfolgt dann eine gezielte Trennung der Stege, die wegen stabilisierten Formen des Bearbeitungsobjekts und der stabilisierten Lage der abzutrennenden Scheibe innerhalb des Bearbeitungsobjekts präzise vom Strahlfokus erfasst werden können.

Darüber hinaus wird durch diese Fortbildung des Verfahrens vermieden, dass hohe Energiemengen in einen eng umgrenzten Bereich eingebracht werden, wodurch Nachteile wie die Bildung großer Gas- oder von Kavitationsblasen sowie Veränderungen des Materials des Bearbeitungsobjekts in Folge thermischer Einflüsse vermieden werden. Insbesondere können die kleinen Gasbläschen im Bereich der in der

ersten Phase durchtrennten Bereiche bereits an die Umgebung abgegeben sein, wenn die Trennung in der letzten Phase erfolgt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer Vorrichtung, welche eine Aufnahmevorrichtung mit einem Träger zum Aufnehmen
5 von zumindest einem Abschnitt eines Bearbeitungsobjekts, und eine Trenneinrichtung, wenigstens eine Laser-Strahlungsquelle und Mittel zur Fokussierung der Laserstrahlung umfasst, wobei der durch die Fokussierung erzeugte Strahlfokus relativ zu dem Träger bewegbar ist, und auf einen Ort der Trennfläche des Bearbeitungsobjekts leitbar ist,
10 um an diesem Ort eine Materialtrennung zu bewirken, zum Mikrotomieren eines Bearbeitungsobjektes.

Diese Verwendungsweise der zuvor beschriebenen Vorrichtung ermöglicht eine frei wählbare Schnitfführung bei der Mikrotomierung. Es kann ein Schnitt in frei wählbarer Tiefe des Bearbeitungsobjekts und mit
15 frei wählbarer Lage ausgeführt werden, wobei diese Parameter durch die Apertur und die Strahlabsorptionseigenschaften des zu schneidenden Gewebes beeinflusst werden. Die Schnittfläche muss bei dieser Verwendungsweise nicht eben sein, sondern kann unregelmäßig und/oder gekrümmt sein. Eine Fixierung des Bearbeitungsobjekts ist
20 nicht erforderlich.

Eine vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrotoms wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren beschrieben. Darin zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Mikrotoms, und
25

Fig. 2 eine schematische, querschnittene Darstellung eines Bearbeitungsobjekts auf einem Träger.

Das in Fig. 1 dargestellte Mikrotom weist eine Glasplatte 3 als Träger für ein Bearbeitungsobjekt („Probe“) 4 auf. Die Glasplatte 3 ist mit einer XYZ-Verfahreinheit 2 verbunden. Durch die Auflage der Probe 4 auf der Glasplatte 3 wird bei weichen, flexiblen Proben eine vorteilhafte Glättung erzielt. Diese Glättungswirkung kann gegebenenfalls durch eine zweite Glasplatte (nicht dargestellt) verstärkt werden, indem die Probe zwischen dieser zweiten Glasplatte und der Glasplatte 3 eingesetzt und gepresst wird.

Auf einer Seite der Glasplatte 3 ist ein Fokussierobjektiv 6 angeordnet, dass mehrere teleskopartig angeordnete Linsen (nicht dargestellt) aufweist. Der Abstand der Linsen zueinander und der Abstand der Linsen zu der Glasplatte 3 kann variiert werden. Auf diese Weise wird die Divergenz/Konvergenz eines Laserstrahls 11, der durch das Fokussierobjektiv 6 hindurch läuft, verändert. Die optische Achse 7 des Fokussierobjektivs 6 liegt senkrecht zu der Plattenebene der Glasplatte 3.

Ebenfalls in der optischen Achse 7 des Fokussierobjektivs 6 ist auf der dem Fokussierobjektiv 6 gegenüberliegenden Seite der Glasplatte 3 eine Zusatzlichtquelle 16 angeordnet. Die Zusatzlichtquelle 16 dient der Beleuchtung der Probe 4 zur Darstellung der Probe oder von Teilen der Probe mittels eines optischen Durchlichtmikroskopieverfahrens.

Die XYZ-Verfahreinheit 2 ist an einem Gehäuse 1 befestigt. Ebenfalls an diesem Gehäuse 1 befestigt ist die Zusatzlichtquelle 16. Innerhalb des Gehäuses 1 sind das Fokussierobjektiv 6 und ein Lasergenerator 10 mit Laser-Strahlungsquelle angeordnet, die den Laserstrahl 11 aussendet. Der Laserstrahl 11 läuft zunächst in etwa parallel zu der Ebene der Glasplatte 3, wird dazu mittels eines teildurchlässigen Spiegels 12 um etwa 90° abgelenkt und verläuft hiernach coaxial zur optischen Achse des Fokussierobjektivs 6.

Durch Verschwenken oder Verschieben des Spiegels 12 kann der Laserstrahl zur optischen Achse 7 abgewinkelt werden und somit der Strahlfokus des Laserstrahls in den parallel zur Ebene der Glasplatte 3 liegenden Richtungen verschoben werden. Am Spiegel 12 ist eine
5 Bewegungseinrichtung 30 befestigt, welche den Spiegel verschieben und verschwenken kann. Vorzugsweise kann der Spiegel um zwei senkrecht zueinander stehende Achsen verschwenkt werden, deren Schnittpunkt dabei vorzugsweise auf der Mittelachse des Laserstrahls 11 liegt. Die Bewegungseinrichtung 30 ist mit einem Rechner 14
10 verbunden, der die Verschwenkung des Spiegels 12 und somit den Ablenkungswinkel des Laserstrahls durch den Spiegel 12 steuert. Eine Verschwenkung des Spiegels 12 aus der in Figur 1 dargestellten Lage bewirkt eine Änderung des Strahlverlaufs im Bereich zwischen dem Spiegel 12 und der Probe 4. Der Laserstrahl verläuft dadurch
15 insbesondere nicht mehr koaxial zu der optischen Achse des Fokussierobjektivs 6.

Zwischen dem teildurchlässigen Spiegel 12 und dem Lasergenerator 10 mit Laser-Strahlungsquelle ist eine Vorfokussiereinrichtung 13 in der Strahlachse des Laserstrahls 11 angeordnet, welche eine Veränderung
20 der Divergenz bzw. der Konvergenz des Laserstrahls ermöglicht. Durch Veränderung der Divergenz bzw. Konvergenz kann die Lage des Strahlfokus in Strahlungsrichtung hinter dem Fokussierobjektiv 6, entlang der optischen Achse des Fokussierobjektives 6 verschoben werden. Die Vorfokussierungseinrichtung 13 besteht aus mehreren
25 Linsen (nicht dargestellt), und zwar vorzugsweise aus zwei Linsen, die teleskopartig angeordnet sind und deren Abstand zueinander verändert werden kann, um hierdurch die Divergenz/Konvergenz des Laserstrahls zu verändern.

Zwischen dem teildurchlässigen Spiegel 12 und dem Fokussierobjektiv 6
30 ist ein teildurchlässiger Beleuchtungsspiegel 12a im Strahlengang des Laserstrahls 11 angeordnet. Durch den Beleuchtungsspiegel 12a wird

Licht, dass aus einer neben dem Laserstrahl angeordneten Lichtquelle 5 zur Beleuchtung der Probe emittiert wird, auf die Probe projiziert, um eine mikroskopische Darstellung der Probe 4 mittels des Auflichtmikroskopieverfahrens zu ermöglichen.

5 Der Laserstrahl 11 wird durch den teildurchlässigen Beleuchtungsspiegel 12a nicht abgelenkt, sondern durchdringt diesen Beleuchtungsspiegel in Richtung auf das Fokussierobjektiv 6.

Hinter dem teildurchlässigen Spiegel 12 ist in der optischen Achse 7 eine Digitalkamera 8 angeordnet. Diese Digitalkamera 8 erfasst die von
10 der Probe 4 reflektierte Strahlung bzw. die von der Zusatzlichtquelle 16 ausgesendete und durch die Probe hindurchgetretene Strahlung. Die Digitalkamera 8 ist mit dem Rechner 14 verbunden, der die von der Kamera 8 übermittelten Bilddaten verarbeitet und eine Darstellung der Probe 4 auf einem Monitor 15 ausgibt.

15 Anstelle der Kamera 8 kann dabei auch eine Okulareinrichtung (nicht dargestellt) vorgesehen sein, die eine direkte Betrachtung der Probe ermöglicht. Weiterhin kann eine Okulareinrichtung mit daran angeetzter digitaler Kamera 8 vorgesehen sein, die sowohl eine direkte Betrachtung als auch eine Betrachtung der Probe auf dem Monitor ermöglicht.

20 Zwischen der Vorfokussiereinrichtung 13 und dem Lasergenerator 10 mit Laser-Strahlungsquelle ist ein teildurchlässiger Ablenkspiegel 12b im Strahlengang des Laserstrahls 11 angeordnet. Der teildurchlässige Ablenkspiegel 12b zweigt einen Teil der von dem Untersuchungsobjekt 4 reflektierten Laserstrahlung in eine OCT-Detektoreinheit 9 ab. Die
25 OCT-Detektoreinheit 9 ist mit dem Rechner 14 verbunden und übermittelt Bilddaten an diesen Rechner 14, der daraus eine Darstellung der Probe mittels der Methode der optischen Kohärenztomographie berechnet und diese Darstellung auf dem Monitor 15 ausgibt. Alternativ kann diese Darstellung der Probe mittels der Methode der optischen

Kohärenztomographie bereits in der OCT-Detektoreinheit 9 berechnet werden und dann direkt auf einem Bildschirm o.ä. dargestellt werden oder zum Zwecke einer Darstellung an den Rechner 14 übermittelt werden.

- 5 Der Rechner 14 dient darüber hinaus der Steuerung der Relativbewegung zwischen dem Strahlfokus und der Glasplatte 3, welche als Träger für die Probe 4 dient. Zu diesem Zweck ist der Rechner 14 mit der Vorfokussiereinrichtung 13, der Bewegungseinrichtung 30 und der XYZ-Verfahreinheit 2 verbunden.
- 10 Darüber hinaus steuert der Rechner 14 das An- und Ausschalten des Lasergenerators 10 mit Laser-Strahlungsquelle und das gepulste Einwirken des Strahlfokus des Laserstrahls auf den Ort der Trennfläche der Probe 4. Zu diesem Zweck ist der Rechner 14 mit der Lasergenerator 10 mit Laser-Strahlungsquelle verbunden.
- 15 Der Rechner 14 kann daher ebenfalls eine Abstimmung zwischen der gepulsten Laserstrahlung, dass heisst der Pulsfrequenz und Einwirkdauer, und der Relativbewegung zwischen Strahlfokus und Probe bzw. Glasplatte 3, welche durch Verfahren der XYZ-Verfahreinheit, Veränderung der Konvergenz/Divergenz in der
- 20 Vorfokussiereinrichtung 13 und/oder Verschwenken/Verschieben der Bewegungseinrichtung 30 erreicht wird.

Wie aus Figur 2 zu erkennen, liegt die Probe 4, durch Schwerkraft gehalten, auf der Glasplatte 3 bündig auf. In der Probe 4 sind mehrere Einschlüsse 21, welche Gasblasen, Festkörper von anderer Konsistenz

25 oder ähnliches sein können.

Der Laserstrahl 11 durchdringt die Glasplatte 3 senkrecht zu deren Plattenebene als konvergierender Strahl 17. Durch die Konvergenz des Strahls 17 wird ein Strahlfokus 22 erzeugt, der an einem Ort einer

Trennfläche 19 eine Materialtrennung verursacht. Durch Verschieben der Glasplatte 3 in einer Richtung senkrecht zu der Längsachse des Laserstrahls 11 bzw. 17 wird der Strahlfokus 22 entlang der Trennfläche 19 bewegt.

- 5 Das erfindungsgemäße Mikrotom ermöglicht darüber hinaus durch Bewegen der Glasplatte 3 in allen drei Raumrichtungen die Führung des Strahlfokus 22 entlang einer gekrümmten Trennfläche, um zum Beispiel eine Aushöhlung zu erzeugen, wie z.B. in Fig. 2 beispielsweise als Trennfläche 20 dargestellt. Dabei kann die Komponente der
- 10 Verfahrbewegung in Richtung der Längsachse des Laserstrahls 11 bzw. 17 auch durch eine Änderung der Konvergenz/Divergenz in der Vorfokussiereinrichtung 13 erreicht werden. Zum Führen des Strahlfokus 22 entlang der Trennfläche 20 wird in diesem Falle eine Verfahrbewegung der Glasplatte 3 in zwei Raumrichtungen (XY-
- 15 Richtung) mit einer Veränderung der Strahlfokuslage in Relation zu der Glasplatte 3 in einer senkrecht zu der XY-Richtung liegenden Richtung durch Veränderung der Konvergenz/Divergenz mittels der Vorfokussiereinrichtung 13 kombiniert.

- Das durch den konvergierenden Laserstrahl 17 in den Strahlfokus 22
- 20 einfallende Laserlicht (Pfeil A in Figur 1) wird von dem Material der Probe 4 im Bereich des Strahlfokus teilweise reflektiert und in Form eines divergierenden Reflektionslaserstrahls 18 (Pfeil B in Fig. 1) zurückgeworfen. Der Reflektionslaserstrahl 18 durchläuft das Fokussierobjektiv 6 und die Vorfokussiereinrichtung 13 in umgekehrter
- 25 Richtung wie der von der Laser-Strahlungsquelle ausgesendete Laserstrahl auf seinem Weg zur Probe 4. Der Reflektionslaserstrahl 18 kann von der OCT-Detektoreinheit erfasst werden und zur Darstellung einer Abbildung der Probe mittels des Verfahrens der optischen Kohärenztomographie verwendet werden.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikrotomiervfahrens mit dem erfindungsgemäßen Mikrotom definiert ein Benutzer zunächst, beispielsweise anhand einer mittels der Kamera 8 oder der OCT-Detektoreinheit 9 gewonnenen Abbildung der Probe 4, 5 eine Umrandung einer Fläche (beispielsweise ein Rechteck oder einen Kreis) und definiert anschließend durch Angabe der Schnitttiefe das auszuschneidende Volumen. Dieses Volumen wird dann herausgetrennt durch automatisches Abrastern mittels Relativbewegung des Strahlfokus entlang der vorgegebenen Fläche in der vordefinierten Tiefe und 10 anschließend mehrmaliges Umfahren der Fläche entlang ihrer Ränder bei gleichzeitig kontinuierlicher oder gestufter Annäherung des Strahlfokus aus der Tiefe der Probe an die Oberfläche.

Patentansprüche

1. Mikrotom, umfassend:
 - eine Aufnahmevorrichtung mit einem Träger (3) zum Aufnehmen von zumindest einem Abschnitt eines Bearbeitungsobjekts (4),
5 und
 - eine Trenneinrichtung (6, 10, 13),
 - wenigstens eine Laser-Strahlungsquelle (10) und
 - Mittel zur Fokussierung (6; 13) der Laserstrahlung umfasst,
- 10 wobei der durch die Fokussierung erzeugte Strahlfokus (22)
 - relativ zu dem Träger (3) bewegbar ist, und
 - auf einen Ort der Trennfläche (19; 20) des Bearbeitungsobjekts (4) leitbar ist, um an diesem Ort eine Materialtrennung zu bewirken,
- 15 wobei Mittel zum gepulsten Einbringen (14) des Strahlfokus in den Ort der Trennfläche vorgesehen sind, die dazu eingerichtet sind, Pulse mit einer Einwirkdauer $< 1 \cdot 10^{-12}$ Sekunde zu erzeugen.
2. Mikrotom nach Anspruch 1,
20 dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Fokussierung (6; 13) der Laserstrahlung dazu eingerichtet sind, den Strahlfokus in zumindest einer Raumrichtung relativ zu dem Träger zu bewegen.
3. Mikrotom nach Anspruch 1 oder 2,
25 dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Führung (12) der Laserstrahlung vorgesehen sind, um den Strahlfokus in zumindest einer Raumrichtung relativ zu dem Träger zu bewegen.
4. Mikrotom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
30 dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zur Fokussierung (6; 13) der Laserstrahlung eine numerische Apertur $\geq 0,65$, vorzugsweise eine numerische Apertur $\geq 1,2$ aufweisen.

5. Mikrotom nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum gepulsten Einbringen
eingerichtet sind, den Strahl pulsierend zu unterbrechen und/oder von
5 dem Ort der Trennfläche wegzulenken.
6. Mikrotom nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum gepulsten Einbringen mit
der Strahlungsquelle zusammenwirken, um den Strahl pulsierend zu
10 unterbrechen.
7. Mikrotom nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass Steuerungsmittel (14) vorgesehen sind,
welche
15
 - die zeitliche Abfolge der Strahlungspausen steuern und/oder mit
Mitteln zur Erfassung der zeitlichen Abfolge der
Strahlungspausen verbunden sind und/oder
 - die Relativbewegung zwischen dem Strahlfokus und dem Träger
in Abhängigkeit von der zeitlichen Abfolge der Strahlungspausen
20 steuern.
8. Mikrotom nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass Steuerungsmittel vorgesehen sind,
welche
25
 - mit Mitteln zur Erfassung der Relativbewegung zwischen dem
Strahlfokus und dem Träger verbunden sind, und
 - die zeitliche Abfolge der Strahlungspausen in Abhängigkeit von
der Relativbewegung steuern.
- 30 9. Mikrotom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass Mittel vorgesehen sind zur Steuerung der
Relativbewegung zwischen dem Träger (3) und dem Strahlfokus (22)
entlang einer gekrümmten Trennfläche (20).

10. Mikrotom nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Beobachtung (9, 8, 14, 15, 5,
16) des Bearbeitungsobjekts vorgesehen sind.

5

11. Mikrotom nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, dass die Beobachtungsmittel ein optisches
Mikroskop umfassen, das nach dem Auflicht- und/oder
Durchlichtverfahren betreibbar ist.

10

12. Mikrotom nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, dass die Beobachtungsmittel Mittel (9, 14) zur
Darstellung von zumindest einem Abschnitt des Bearbeitungsobjekts
anhand der zurück gestreuten Laserstrahlung beinhalten.

15

13. Mikrotom nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, dass die Darstellungsmittel umfassen:

- einen Detektor (9) zur Erfassung der von dem Abschnitt der
Bearbeitungsobjekt zurückgestreuten Strahlung,
- 20 - Mittel zur Erfassung (9) der von einer Referenzebene
reflektierten kohärenten Strahlung, und
- Mittel zur Erzeugung (9; 14) einer bildlichen Darstellung des
Abschnitts der Bearbeitungsobjekt mittels Überlagerung der von
dem Abschnitt der Bearbeitungsobjekt zurück gestreuten
25 Laserstrahlung und der von der Referenzebene reflektierten
kohärenten Strahlung.

14. Verfahren zum Mikrotomieren von Bearbeitungsobjekten (4), mit den Schritten

- Aufnehmen von zumindest einem Abschnitt des Bearbeitungsobjekts durch einen Träger (3) einer Aufnahmeeinrichtung,
- zumindest teilweises Trennen des Bearbeitungsobjekts mittels einer Schneideinrichtung,

dadurch gekennzeichnet, dass

- eine Laserstrahlung (11) von einer der Schneideinrichtung zugeordneten Strahlungsquelle (10) abgegeben wird und
- diese Laserstrahlung fokussiert wird und der Strahlfokus (22) pulsierend auf einen Ort einer Trennfläche (19; 22) eines Bearbeitungsobjekts geleitet wird, um an diesem Ort eine Materialtrennung zu erzeugen, wobei der Strahlfokus (22) relativ zu dem Träger (3) in zwei oder drei Raumrichtungen bewegt wird, so dass das Bearbeitungsobjekt mikrotomiert wird

15. Verfahren nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, dass die Einwirkdauer eines Pulses $< 1 \times 10^{-12}$

Sekunde ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,

dadurch gekennzeichnet, dass der Strahlfokus entlang einer gekrümmten Fläche (20) geführt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, dass die Abfolge der Pulse und die Relativbewegung zwischen Träger und Strahlfokus zeitlich zueinander gesteuert werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, dass die Trennfläche vor dem Schneidvorgang
vorherbestimmt wird und der Strahlfokus entlang dieser Trennfläche
automatisch entlang geführt wird.

5

19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Schneidvorgang eine Abbildung
zumindest eines Abschnitts des Bearbeitungsobjekts mittels eines
lichtmikroskopischen Abbildungsverfahrens erstellt wird und die
10 Vorherbestimmung der Trennfläche anhand dieser Abbildung
vorgenommen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Schneidvorgang eine Abbildung
15 zumindest eines Abschnitts des Bearbeitungsobjekts mittels des
Verfahrens der optischen Kohärenztomographie erstellt und die
Vorherbestimmung der Trennfläche anhand dieser Abbildung
vorgenommen wird.

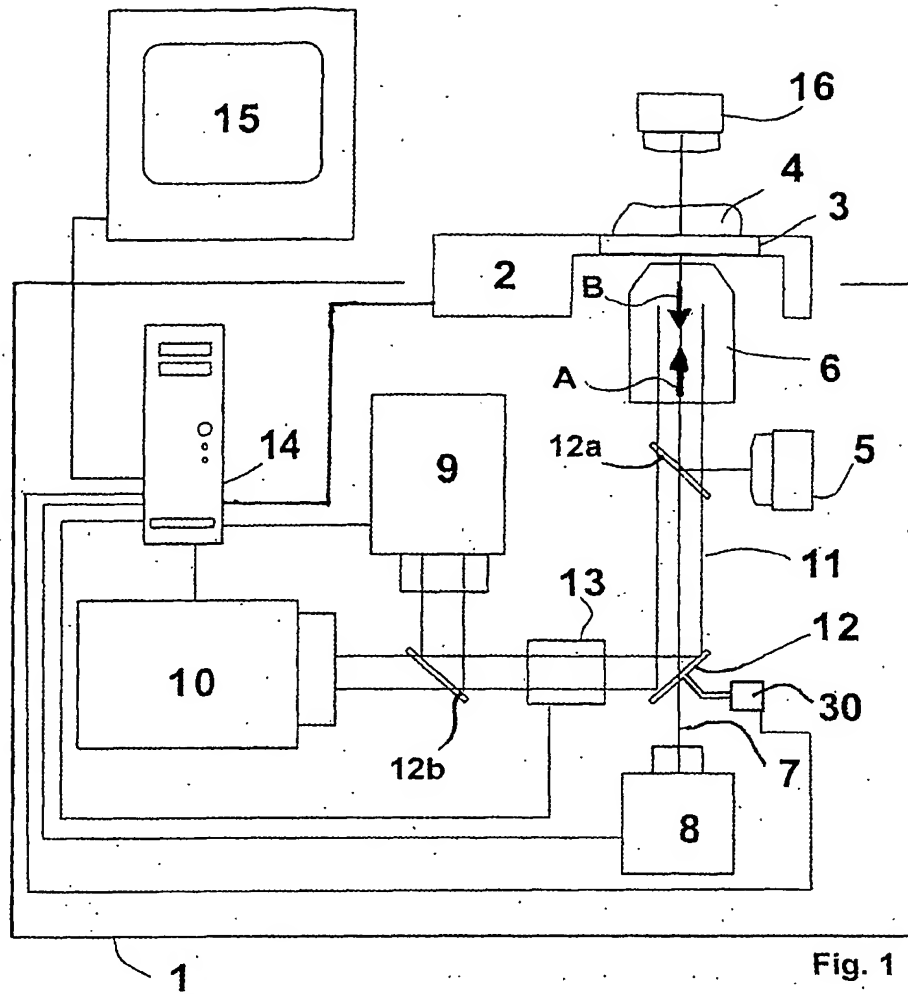
20 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18,
dadurch gekennzeichnet, dass während des Schneidvorgangs eine
Abbildung zumindest eines Abschnitts des Bearbeitungsobjekts mittels
eines lichtmikroskopischen Abbildungsverfahrens und/oder des
Verfahrens der optischen Kohärenztomographie erstellt wird und dem
25 Benutzer eine Wiedergabe dieser Abbildung bereit gestellt wird, anhand
welcher er den Strahlfokus führen kann.

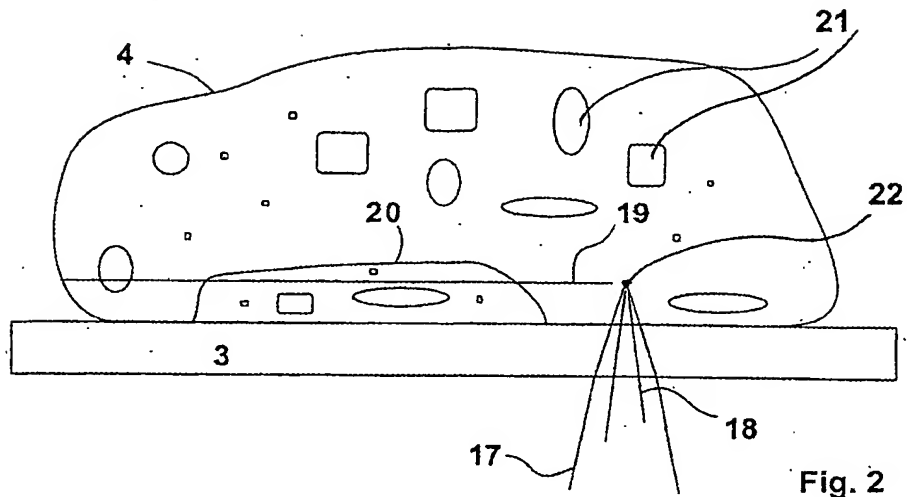
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21,

dadurch gekennzeichnet, dass in einer ersten Phase des Schneidvorgangs ein oder mehrere voneinander beabstandete Bereiche der Trennfläche getrennt werden und in einer letzten Phase des Schneidvorgangs eine vollständige Trennung entlang der Trennfläche erfolgt, indem die zwischen den beabstandeten Bereichen liegenden Bereiche getrennt werden.

23. Verwendung einer Vorrichtung, umfassend

- eine Aufnahmevorrichtung mit einem Träger (3) zum Aufnehmen von zumindest einem Abschnitt eines Bearbeitungsobjekts (4),
- eine Trenneinrichtung (6, 10, 13),
- wenigstens eine Laser-Strahlungsquelle (10), und
- Mittel zur Fokussierung (6; 13) der Laserstrahlung, wobei der durch die Fokussierung erzeugte Strahlfokus (22)
- relativ zu dem Träger (3) bewegbar ist, und auf einen Ort der Trennfläche (19; 20) des Bearbeitungsobjekts (4) leitbar ist, um an diesem Ort eine Materialtrennung zu bewirken, zum Mikrotomieren eines Bearbeitungsobjektes (4).





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N1/06 G01N1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/057746 A (GANSER MICHAEL ;WEISS ALBRECHT (DE); LEICA MICROSYST GMBH (DE)) 25 July 2002 (2002-07-25) page 9, line 3 -page 10, line 8; figure 7	1-23
Y	DE 100 20 559 A (HANNOVER LASER ZENTRUM) 31 October 2001 (2001-10-31) paragraphs '0001!-'0011! paragraph '0037!; figure 1	1-3,5-23
Y	US 2002/164678 A1 (GANSER MICHAEL ET AL) 7 November 2002 (2002-11-07) page 1, column 2, paragraph 16; figures 1,3	4
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2004

Date of mailing of the international search report

04/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cantalapiedra, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/14951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/78937 A (WEISS ALBRECHT ;LEICA MICROSYST GMBH (DE)) 25 October 2001 (2001-10-25) page 9, line 15-25; figure 1	3, 18
A	LUBATSCHOWSKI H ET AL: "APPLICATION OF ULTRASHORT LASER PULSES FOR INTRASTROMAL REFRACTIVE SURGERY" GRAEFE'S ARCHIVE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, SPRINGER VERLAG, XX, vol. 238, January 2000 (2000-01), pages 33-39, XP001014554 ISSN: 0721-832X the whole document	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14951

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N1/06 G01N1/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	WO 02/057746 A (GANSER MICHAEL ;WEISS ALBRECHT (DE); LEICA MICROSYST GMBH (DE)) 25. Juli 2002 (2002-07-25) Seite 9, Zeile 3 -Seite 10, Zeile 8; Abbildung 7	1-23
Y	DE 100 20 559 A (HANNOVER LASER ZENTRUM) 31. Oktober 2001 (2001-10-31) Absätze '0001!-'0011! Absatz '0037!; Abbildung 1	1-3,5-23
Y	US 2002/164678 A1 (GANSER MICHAEL ET AL) 7. November 2002 (2002-11-07) Seite 1, Spalte 2, Absatz 16; Abbildungen 1,3	4
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. April 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/05/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cantalapiedra, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14951

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	WO 01/78937 A (WEISS ALBRECHT ;LEICA MICROSYST GMBH (DE)) 25. Oktober 2001 (2001-10-25) Seite 9, Zeile 15-25; Abbildung 1 -----	3,18
A	LUBATSCHOWSKI H ET AL: "APPLICATION OF ULTRASHORT LASER PULSES FOR INTRASTROMAL REFRACTIVE SURGERY" GRAEFE'S ARCHIVE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, SPRINGER VERLAG, XX, Bd. 238, Januar 2000 (2000-01), Seiten 33-39, XP001014554 ISSN: 0721-832X das ganze Dokument -----	1-23

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14951

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02057746 A	25-07-2002	DE 10102034 A1	08-08-2002
		WO 02057746 A2	25-07-2002
		DE 10290161 D2	15-04-2004
DE 10020559 A	31-10-2001	DE 10020559 A1	31-10-2001
		AU 6590001 A	12-11-2001
		WO 0183155 A1	08-11-2001
		EP 1284839 A1	26-02-2003
		US 2003110862 A1	19-06-2003
US 2002164678 A1	07-11-2002	DE 10018255 A1	25-10-2001
		AU 7383801 A	30-10-2001
		WO 0179806 A1	25-10-2001
		EP 1279016 A1	29-01-2003
		JP 2003531369 T	21-10-2003
		TW 496958 B	01-08-2002
WO 0178937 A	25-10-2001	DE 10018253 A1	25-10-2001
		AU 5612901 A	30-10-2001
		WO 0178937 A1	25-10-2001
		EP 1276586 A1	22-01-2003
		JP 2003531393 T	21-10-2003
		TW 486566 B	11-05-2002
		US 2003133190 A1	17-07-2003